

BAB III. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan metode ekperimental murni dengan pendekatan *post-test only controled group*. Penelitian ini dilakukan dengan mengamati secara mikroskopis untuk menilai gambaran histopatologi testis mencit dengan perlakuan berbeda yaitu ekstrak metanol buah mahkota dewa dan kontrol negatif.

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Riset Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia, Yogyakarta selama \pm 8 bulan.

3.3 Populasi dan Subjek Penelitian

Subjek penelitian adalah mencit (*Mus musculus*) Balb/C. Besar sampel dihitung menggunakan rumus Festing (Charan & Kantharia, 2013) dengan perhitungan :

$E = \text{Jumlah total sampel} - \text{Jumlah total kelompok}$

$E = (nxt)-t$

$E = 20 - 4$

$E = 16$

Jika 16 dibagi 4 kelompok, maka tiap kelompok masing-masing 4

Keterangan : nilai rentang yang harus dicapai (10-20) (E), jumlah sampel tiap kelompok (n), jumlah total kelompok perlakuan (t)

Penelitian ini membagi sampel menjadi 4 kelompok. Berdasarkan perhitungan tersebut, jumlah minimal sampel tiap kelompok adalah 4 ekor mencit. Penelitian kali ini menggunakan 5 ekor mencit pada tiap kelompok. Sampel diambil secara acak dari populasi kandang hewan coba. Kriteria inklusi : berat badan 20-30 gram, umur 6-8 minggu, dalam keadaan sehat (tanpa luka, kulit dan bulu halus, aktif bergerak, dan tidak terdapat kelainan anatomis). Kriteria eksklusi : mati saat selama aklimatisasi atau diberi perlakuan. Subjek penelitian didapatkan dari Laboratorium Fisiologi FK UII Yogyakarta.

3.4 Variabel Penelian

3.4.1 Variabel Bebas

Dosis ekstrak metanol daging buah mahkota dewa

3.4.2 Variabel Terikat

Gambaran histopatologi testis mencit.

3.5 Definisi Operasional

3.5.1 Uji Toksisitas Subkronik

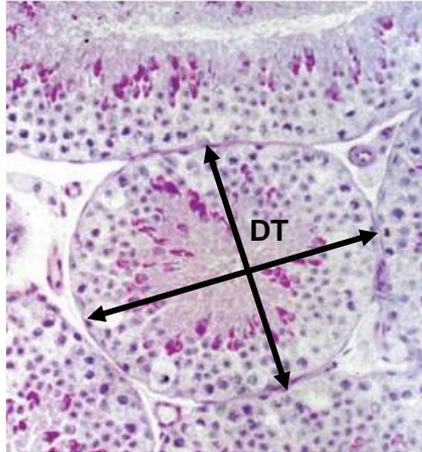
Uji toksisitas subkronik yang dilakukan pada penelitian ini adalah suatu pengujian untuk mendeteksi efek toksik yang muncul setelah pemberian sediaan uji secara berulang selama 28 hari melalui oral pada hewan uji.

3.5.2 Ekstrak Metanol Daging Buah Mahkota Dewa

Ekstrak buah mahkota dewa adalah hasil ekstraksi daging buah mahkota dewa yang didapat melalui maserasi dengan bahan metanol selama 3x24 jam. Buah mahkota dewa didapatkan dari pohon yang tumbuh di daerah Kaliurang. Ekstrak metanol daging buah mahkota dewa diberikan 1x sehari selama 28 hari pada hewan coba per oral. Penelitian Sulistyoningrum *et al.* (2013) menggunakan dosis 250 mg/kgBB dan menggunakan subjek penelitian *Rattus novergicus*. Dosis pada penelitian tersebut memberikan efek perbaikan pada gambaran histologi glomerulus pada hewan coba diabetes melitus yang diinduksi aloksan. Penelitian ini menggunakan subjek penelitian mencit, maka dosis perlu dilakukan konversi penghitungan dosis dengan pengalihan dengan faktor konversi dosis tikus ke mencit 0,14 berdasarkan pada tabel konversi (lampiran 1). Dosis yang digunakan pada penelitian ini adalah $125 \text{ mg/kgBB} \times 0,14 = 17,5 \text{ mg/kgBB}$, $250 \text{ mg/kgBB} \times 0,14 = 35 \text{ mg/kgBB}$, dan $500 \text{ mg/kgBB} \times 0,14 = 70 \text{ mg/kgBB}$.

3.5.3 Gambaran Histopatologi Testis Mencit

Gambaran histopatologi testis mencit dinilai dari diameter tubulus seminiferus. Pengukuran diameter tubulus seminiferus dilakukan sebanyak 2 kali ulangan. Diameter dari masing –masing tubulus seminiferus dirata-rata untuk tiap tikus. Nilai masing-masing tubulus seminiferus tikus dijumlah dan dirata-rata untuk nilai kelompok. Gambaran diamati pada 5 lapang pandang dan diamati 2 tubulus yang relatif bulat pada tiap potongan testis mencit dengan menggunakan mikroskop cahaya perbesaran 100x.



Gambar 7. Penghitungan Diameter Tubulus Seminiferus

Keterangan : Diameter tubulus seminiferus dihitung sebanyak 2 kali ulangan
(dipilih 2 sisi yang saling tegak lurus)

3.6 Instrumen Penelitian

3.6.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah kandang hewan coba dengan tempat pakan dan minum, timbangan dengan skala gram, timbangan dengan skala miligram, alat-alat gelas, set alat bedah, tempat penampung hewan coba dan organ yang diawetkan, mikroskop, kaca objek.

3.6.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak metanol daging buah mahkota dewa, aquadestilata, bahan pewarna untuk pemeriksaan pewarnaan *Hematoksin Eosin*, bahan pakan dan minum hewan coba (pelet ADII dan air *Reverse Osmosis*[®]), bahan untuk prosesing jaringan dengan metode parafin.

3.7 Alur Penelitian

3.7.1 Pembuatan Ekstrak

Mahkota dewa yang digunakan dalam penelitian ini didapatkan dari Merapi Herbal Farma di daerah Kaliurang, Yogyakarta. Determinasi tanaman mahkota dewa dilakukan di laboratorium Sistematika Tumbuhan Fakultas Biologi UGM (lampiran 2). Daging buah diiris dan dikeringkan dengan oven dengan suhu 70°C selama 3 hari. Daging buah yang sudah kering, digiling dan diperoleh serbuk berserat. Serbuk ditambahkan metanol selama 3 hari berturut-turut dengan pergantian pelarut yang baru. Filtrat dari ketiga hari ekstraksi dijadikan satu dan

dievaporasi. Hasil evaporasi kemudian diuapkan dengan *waterbath* sampai diperoleh ekstrak kental.

3.7.2 Persiapan Hewan Model

Hewan coba yang digunakan adalah mencit (*Mus musculus*) Balb/C berumur 6-8 minggu dengan berat 20-30 gram. Hewan coba dilakukan aklimatisasi selama tujuh hari sebelum penelitian, total hewan yang dibutuhkan pada penelitian ini berjumlah 20 ekor. Masing-masing kelompok perlakuan menggunakan hewan yang terdiri dari 5 ekor hewan jantan. Setelah dilakukan penimbangan berat badan hewan coba, hewan akan dikelompokkan secara acak agar berat badan merata untuk semua kelompok. Hewan dipelihara dalam suhu ruangan diatur menjadi $22^{\circ} \pm 3^{\circ}\text{C}$, dengan kelembaban relatif 30-70%, dan penerangan 12 jam terang 12 jam gelap. Setiap hari semua hewan model diberi pakan standar dan minum secara *ad libitum*. Penelitian kali ini membagi mencit dalam 4 kelompok perlakuan.

Tabel 2. Pengelompokan Sampel Berdasarkan pada Perlakuan

Kelompok A-Kontrol (1ml aquades)	Kelompok B-Pemberian Ekstrak Metanol Daging Buah Mahkota Dewa 17,5 mg/kgBB	Kelompok C-Pemberian Ekstrak Metanol Daging Buah Mahkota Dewa 35 mg/kgBB	Kelompok D-Pemberian Ekstrak Metanol Daging Buah Mahkota Dewa 70 mg/kgBB
A1	B1	C1	D1
A2	B2	C2	D2
A3	B3	C3	D3
A4	B4	C4	D4
A5	B5	C5	D5

3.7.3 Pemberian Perlakuan pada Hewan Model

Penelitian yang dilakukan oleh Sulistyoningrum *et al.* (2013), dosis ekstrak daging buah mahkota dewa yang memiliki efek dalam mencegah komplikasi diabetes melitus adalah 250 mg/kg BB. Dosis yang diberikan untuk kelompok perlakuan pada penelitian kali ini terbagi menjadi 3 tingkat dosis, dengan cara menggunakan kelipatannya. Besar dosis yang diberikan sebesar setengah dosis, dosis, dan dua kali dosis, yaitu sebesar 17,5 mg/kgBB, 35 mg/kgBB, 70 mg/kgBB

dalam bentuk larutan akuadestilata dengan volume 1 ml. Masing-masing kelompok diberi perlakuan sebagai berikut :

- a) Kelompok A : 1 ml akuades (kontrol)
- b) Kelompok B : ekstrak daging buah mahkota dewa 17,5 mg/kgBB
- c) Kelompok C : ekstrak daging buah mahkota dewa 35 mg/kgBB
- d) Kelompok D : ekstrak daging buah mahkota dewa 70 mg/kgBB

3.7.4 Pembuatan dan Pengamatan Preparat

Setelah dilakukan perlakuan sesuai jadwal 28 hari, mencit pada tiap kelompok dosis diterminasi. Terminasi dilakukan dengan cara dislokasi servikal. Sesudah diterminasi, mencit dibedah dan diambil testis bagian kanan. Testis tersebut ditimbang menggunakan timbangan dengan skala miligram dan segera dimasukkan dalam larutan dapar formaldehida 10% dan dibuat preparat histopatologi dengan metode parafin. Pengecatan pada preparat menggunakan pewarna HE kemudian dilakukan pengamatan di bawah mikroskop cahaya dengan perbesaran 100x untuk melihat diameter tubulus seminiferus. Preparat diamati secara *single blind* serta dinilai oleh dua pengamat agar dapat mengurangi bias saat mengukur diameter tubulus seminiferous.

3.8 Rencana Analisis Data

Data hasil perhitungan diameter tubulus seminiferus akan dilakukan tabulasi dan diuji normalitas dengan Uji Saphiro Wilk. Jika syarat uji parametrik terpenuhi, dilakukan Uji ANOVA dilanjutkan post hoc LSD, apabila tidak terpenuhi dilakukan uji alternatif Uji Kruskal Wallis dilanjutkan post hoc Mann Whitney. Semua data yang dihasilkan diolah dengan program komputer dengan tingkat kepercayaan 95%.

3.9 Etika Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian bagian dari penelitian Sulistyoningrum pada tahun 2018, dengan judul “Uji Toksisitas Subkronis Ekstrak Daging Buah Mahkota Dewa (*Phalleria macrocarpa* (Sheff.) Boerl.) Sebagai Upaya Pengembangan Antidiabetes dan Antikomplikasi Diabetes” telah mendapatkan persetujuan kaji etik dengan nomor surat 10/Ka.Kom.Et/70/KE/XI/2017 (lampiran 3).